

(54) STAINING OF TRUE FUNGI AND REAGENT THEREFOR

- (11) 5-130890 (A) (43) 1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-321214 (22) 1991
 (71) BIO MEITO K.K. (72) YOSHIKIMI OKAMOTO(2)
 (51) Int. Cl⁵. C12Q1/04

PURPOSE: To easily judge the presence of true fungi in a short time in high sensitivity without using skilled labor by masking a readily co-dyeable part of a specimen other than true fungi with a stain composed of hematoxylin and staining the true fungi in the specimen with a specific stain.

CONSTITUTION: The readily co-dyeable part of a specimen other than true fungi is masked by staining with a 1st stain containing hematoxylin as an essential component. The true fungi in the specimen are stained with a 2nd stain containing (A) an anionic polyhydric phenol compound of formula (n) is 3-10) and (B) a fluorescent brightener for cellulose (e.g. 4,4'-bis(2-di-(2-hydroxyethyl) amino-4-(3-sulfophenylamino)-1,3,5-triazin-6-ylamino-stilbene-2,2'-sulfonic acid sodium salt) or a fluorescent direct dye (preferably a condensation product of 4-amino-3-sulfo-naphthalenic anhydride and p-toluidine) as essential components.

(54) METHOD FOR CONFIRMING STERILIZED EFFECT IN ASEPTIC CHAMBER

- (11) 5-130892 (A) (43) 28.5.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-297176 (22) 13.11.1991
 (71) DAINIPPON PRINTING CO LTD (72) MASATOSHI TAKAGI(2)
 (51) Int. Cl⁵. C12Q1/22

PURPOSE: To accurately judge the sterilized state even in the case of spraying a sterilizing liquid into an aseptic chamber and washing with water by using a biological indicator produced by supporting an indicator microorganisms on a membrane filter.

CONSTITUTION: A biological indicator produced by supporting an indicator microorganisms on a membrane filter is placed in a chamber. A sterilizing liquid is sprayed into the chamber to effect the sterilization of the chamber, the biological indicator is taken out of the chamber and the presence of the surviving index microorganisms is determined. The index microorganism is preferably a mold in the case of using a mixture of hydrogen peroxide and peracetic acid as the sterilizing liquid.

(54) REAGENT COMPOSITION FOR DETERMINATION OF THIOL COMPOUND

- (11) 5-130897 (A) (43) 28.5.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-321446 (22) 11.11.1991
 (71) TERUMO CORP (72) HIROSHI SUZUKI
 (51) Int. Cl⁵. C12Q1/44, C12Q1/06, G01N31/00, G01N31/22, G01N33/49, G01N33/50

PURPOSE: To provide the subject composition containing a cobalt(II) salt and a complex formation promoting agent and effective for detecting a thiol compound, a hydrolase and accordingly leukocyte in high sensitivity and accuracy without using expensive instrument, complicate operation, skilled labor, etc.

CONSTITUTION: The objective composition contains (A) a cobalt(II) salt (e.g. cobalt(II) acetate and cobalt(II) chloride) and (B) a complex formation promoting agent at a weight ratio (A:B) of preferably (3-15):1. The component B is preferably a combination of a cationic surfactant with a component selected from quinoline compounds (e.g. quinaldine), quinazoline compounds (e.g. quinazoline), sulfanyl compounds (e.g. sulfanyl amide) and stilbazole compounds (e.g. 2-stilbazole).

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-130897

(43)公開日 平成5年(1993)5月28日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/44		6807-4B		
		6807-4B		
G 0 1 N 31/00	P	7906-2 J		
	V	7906-2 J		
31/22	1 2 2	9015-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-321446

(22)出願日 平成3年(1991)11月11日

(71)出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72)発明者 鈴木 宏

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

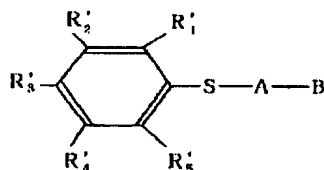
(74)代理人 弁理士 辻 良子

(54)【発明の名称】 チオール化合物測定用試薬組成物

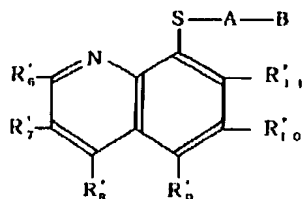
(57)【要約】

【構成】 コバルト(II)塩及び錯体形成促進剤を含有するチオール化合物測定用試薬組成物、並びに下記の化学式1又は化学式2；

【化1】



【化2】



(式中Aはアミノ酸残基又は2～5のアミノ酸残基からなるペプチド基、Bはアミノ基の保護基、R'1～R'6及

びR'6～R'11は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、ニトロ基、水酸基、アルキル基、アリール基等から選ばれる基)で表されるチオエステル化合物、コバルト(II)塩及び錯体形成促進剤を使用して加水分解酵素や白血球を検出する方法。

【効果】 高感度で且つ短時間に、水性溶液中に含まれるチオール化合物を特異的に測定することができ、更に検体中の加水分解酵素、白血球を高感度で特異的に検出することができる。

1

2

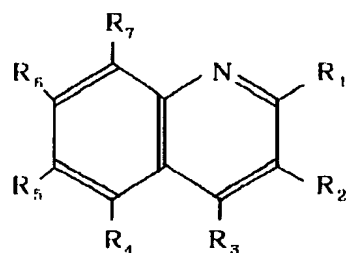
【特許請求の範囲】

【請求項1】 コバルト(II)塩及び錯体形成促進剤を含むことを特徴とするチオール化合物測定用試薬組成物。

*

* 【請求項2】 錯体形成促進剤が、イオン性界面活性剤、下記の式(I)；

【化1】

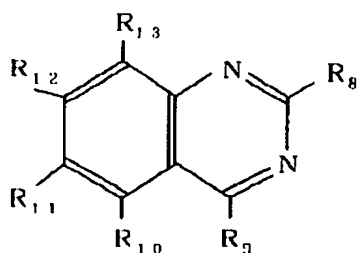


(I)

(式中、R₁～R₇は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコシキル基、アリール基、ニトロ基、スルホン酸基、カルボキシ基およびアミノ基から※

※選ばれる基を示す)で表されるキノリン系化合物、下記の式(II)；

【化2】

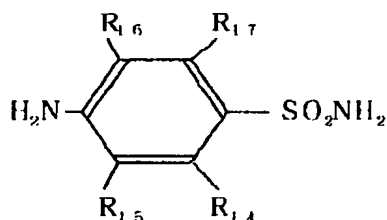


(II)

(式中、R₈～R₁₃は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコシキル基、アリール基、ニトロ基、スルホン酸基、カルボキシ基およびアミノ基から★

★ら選ばれる基を示す)で表されるキナゾリン系化合物、下記の式(III)；

【化3】

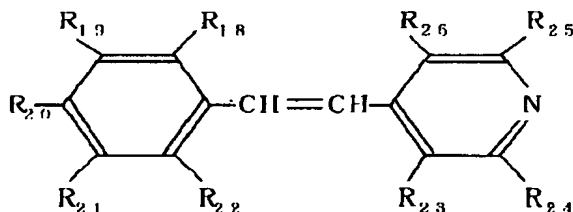


(III)

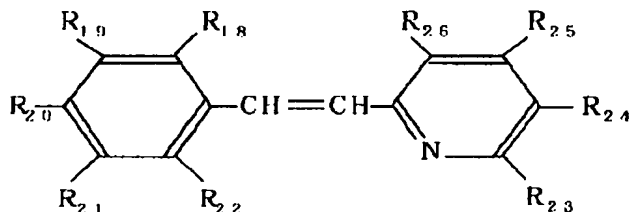
(式中、R₁₄～R₁₇は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコシキル基およびアリール基から選ばれる基を示す)で表されるスルファニルアミド系☆

☆化合物、および下記の式(IV_a)または(IV_b)；

【化4】

(IV_a)

【化5】

(IV_b)

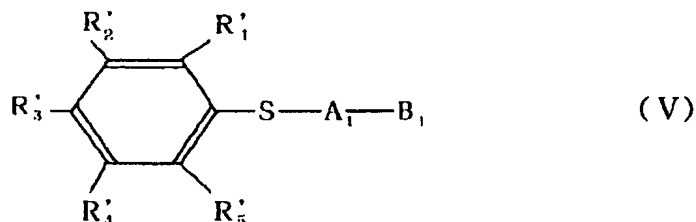
(式中、R₁₈～R₂₆は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコシキル基およびアリール基から選ばれる基を示す)で表されるスチルバゾール系化合物からなる群から選ばれる少なくとも1種の化合物であ

る請求項1の試薬組成物。

【請求項3】 請求項1または請求項2の試薬組成物を使用してチオール化合物を検出する方法。

【請求項4】 下記の式(V)；

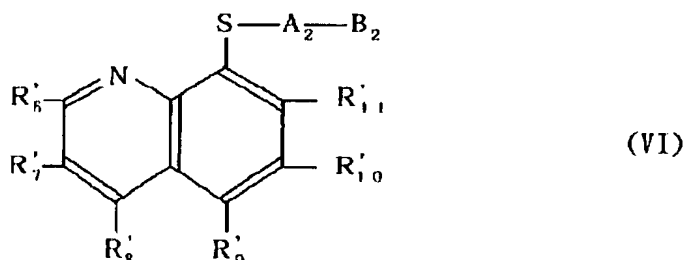
【化6】



(式中、A₁はアミノ酸残基または2～5のアミノ酸残基からなるペプチド基、B₁はアミノ基の保護基、そしてR'₁～R'₅は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシル基、水酸基、アリール基、アシル基、ニトロ基、チオアルキル基およびアルキルアミ*

*ノ基よりなる群基から選ばれる基であり、それぞれ隣接する2個の置換基分は縮合芳香環を形成していてもよい)で表されるチオエステル系化合物および下記の式(VI)；

【化7】



(式中、A₂はアミノ酸残基またはペプチド残基、B₂は窒素保護基であり、そしてR'₆～R'₁₁は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシル基、アリール基、アルアルキル基およびアルアルコキシル基から選ばれる基、或はR'₆～R'₁₁のうちの2つの隣接する基が結合して縮合環を形成していてもよい基を示す)で表されるチオエステル系化合物の少なくとも1種、コバルト(II)塩並びに錯体形成促進剤を使用して加水分解酵素を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、チオール化合物測定用試薬組成物、該試薬組成物を使用するチオール化合物の検出方法、並びに加水分解酵素を検出する方法に関する。

【0002】

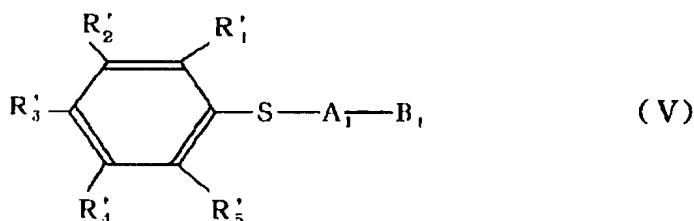
【従来の技術】尿中に出現する白血球を検出することに※

※より、腎臓、泌尿生殖器、尿路等の疾病の診断が可能である。また、腹膜透析液中の白血球のモニタリングにより腹膜炎が早期に発見できることも知られている。従来、被検査液中の白血球の検出は、顕微鏡で液中の白血球数を数えることにより行われていたが、この方法は高価な機器、長い測定時間、複雑な操作、熟練等を要し、更に崩壊していない完全な白血球しか測定できないという欠点を有していた。

【0003】上記従来法の欠点を解決するために、白血球中の加水分解酵素を検出し、それによって白血球量を測定する検出法が近年試みられており、この方法は鏡検により白血球数を数える上記従来法に比べて、操作が容易で短時間で結果が得られ、しかも崩壊した白血球でも検出できるという利点を有している。そして、本発明者らは先に下記の式(V)；

【0004】

【化8】



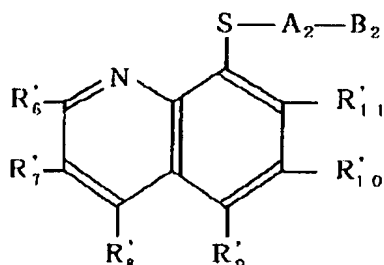
(式中、A₁はアミノ酸残基または2～5のアミノ酸残基からなるペプチド基、B₁はアミノ基の保護基、そしてR'₁～R'₅は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシル基、水酸基、アリール基、アシル基、ニトロ基、チオアルキル基およびアルキルアミ★

★ノ基よりなる群基から選ばれる基であり、それぞれ隣接する2個の置換基分は縮合芳香環を形成していてもよい)で表されるチオエステル系化合物および下記の式(VI)；

【化9】

5

6



(VI)

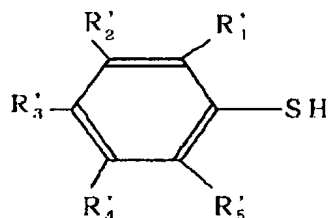
(式中、 A_2 はアミノ酸残基またはペプチド残基、 B_2 は窒素保護基であり、そして $R'_6 \sim R'_{11}$ は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシル基、アリール基、アルアルキル基およびアルアルコキシル基から選ばれる基、或は $R'_6 \sim R'_{11}$ のうちの2つの隣接する基が結合して縮合環を形成していてもよい基を示す)で表されるチオエステル化合物からなる酵素基質を見出し、この酵素基質を使用すると白血球中の加水分解酵素、ひいては白血球自体を検出できることを見出し*

* 特先に出願した(特願平3-191921号および特願平2-308689号)。

【0006】上記式(V)および式(VI)で表されるチオエステル化合物は、白血球に含まれる加水分解酵素によって、そのチオエステル結合、すなわち式(V)および式(VI)におけるSとAとの間の結合が切断されて、下記の式(VII)；

【0007】

【化10】

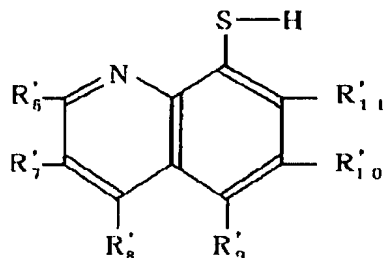


(VII)

(式中、 $R'_1 \sim R'_5$ は上記と同じ基を示す)で表されるチオフェノールおよび下記の式(VIII)；

※【0008】

※【化11】



(VIII)

(式中、 $R'_6 \sim R'_{11}$ は上記と同じ基を示す)で表されるチオフェノールを生じ、これらのチオフェノールの有無や量を測定することによって、加水分解酵素ひいては白血球を検出測定することができる。

【0009】一方、上記で生成した式(VII)および式(VIII)で表されるチオフェノールをも含めて、生体成分中や環境試料中などのSH基を有するチオール化合物の検出には、従来、銀メルカプチドの生成による滴定法、水銀メルカプチドによる滴定法、ヨウ素や銅イオンによる酸化滴定法、臭素滴定法等が主に使用されてきたが、いずれも操作が複雑であったり、感度が悪い等の問題があった。

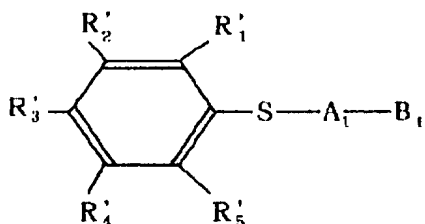
【0010】その後、高感度で操作が容易であり、しかも定量精度の良いチオール化合物用の検出剤として、チオール化合物と直接特異的に反応して呈色変化をきたすジスルフィド系化合物やベンツヒドロール系化合物が用いられるようになってきた。しかしながら、これらの化

合物による場合はチオール化合物との反応生成物の呈色状態が黄色であることにより尿自体の色との区別がつくにくく、目視による半定量ができにくかったり、または反応の結果生じた色が被検査液体中の他の成分により影響を受け易く、確実に安定した検出が困難である等の問題があった。

40 【0011】また、コバルト(II)塩は、非水溶媒、特にイソプロパノール中でチオフェノール、p-トルエンチオール、p-ニトロチオフェノール、p-クロロチオフェノール等のチオフェノール系化合物と紫色の錯体を形成することが知られており、この性質を利用してチオフェノール系化合物を吸光光度定量により検出測定することが行われている。しかし、上記の錯体形成反応は、水溶液中ではほとんど進行しないため、尿、体液、その他の水性液体中に対しては適用できないという欠点があった。

50 【0012】

【発明の内容】上記の点から、本発明者らは、高価な機器、長い測定時間、複雑な操作、熟練等を必要とすることなく、高感度で且つ高い精度で、水性溶液中に含まれるチオール化合物、加水分解物酵素、ひいては白血球を検出することができる試薬および検出方法を得ることを目的として研究を行ってきた。その結果、コバルト(II)塩と錯体形成促進剤を含む組成物を使用すると、チオール化合物を簡単な操作で高感度で且つ高精度で検出できること、更に該コバルト(II)塩および錯体形成促進剤を上記した式(V)で表されるチオエステル化合物と組み*

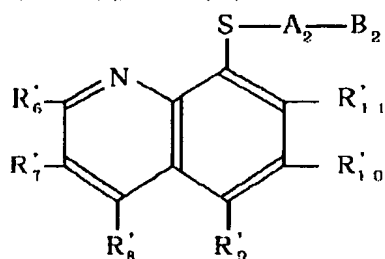


(V)

(式中、A₁、B₁およびR'₁~R'₅は上記したと同じ基を示す)で表されるチオエステル化合物〔以後「チオエステル化合物(V)」という〕および下記の式(VI)； ※

※【0015】

【化13】



(VI)

(式中、A₂、B₂およびR'₆~R'₁₁は上記したと同じ基を示す)で表されるチオエステル化合物〔以後「チオエステル化合物(VI)」という〕の少なくとも1種、コバルト(II)塩並びに錯体形成促進剤を使用して加水分解酵素を検出する方法である。

【0016】上記本発明でいう、「チオール化合物」とはチオフェノールに限らず、SH基を有する化合物の総称であり、したがって本発明のチオール化合物測定用試薬組成物およびチオール化合物の検出方法は、SH基を有する化合物であれば、無機チオール化合物および有機チオール化合物のいずれに対してもその検出および測定のために使用することができる。そのうちでも、本発明のチオール化合物測定用試薬組成物およびチオール化合物の検出方法は、チオフェノール系化合物、チオアルコ★

★ール系化合物、チオグリコール系化合物、等のチオール化合物の検出・測定に特に適している。

【0017】そして本発明では、コバルト(II)塩としては、水性液体や有機液体等の被検査液体中で解離性であるコバルト(II)の塩であればどのようなものでもよく、例えば酢酸コバルト(II)、硝酸コバルト(II)、塩化コバルト(II)、硫酸コバルト(II)等の無機コバルト(II)塩および有機コバルト(II)塩のいずれれもが使用できる。

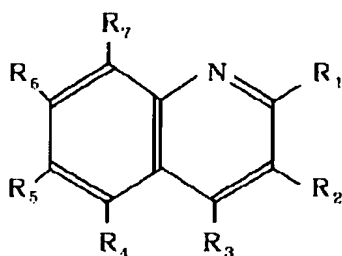
【0018】また、コバルト(II)塩と共に使用する上記の錯体形成促進剤としては、

① イオン性界面活性剤、

② 下記の式(I)；

【0019】

【化14】



(I)

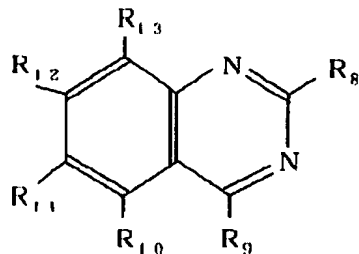
(式中、R₁~R₇は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコシキル基、アリール基、ニトロ

基、スルホン酸基、カルボキシル基およびアミノ基から選ばれる基を示す)で表されるキノリン系化合物、

③ 下記の式 (II) ;
【0020】

* 【化15】

*



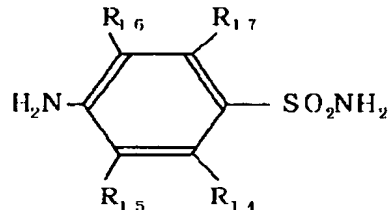
(II)

(式中、R₈~R₁₃は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコシキル基、アリール基、ニトロ基、スルホン酸基、カルボキシル基およびアミノ基から選ばれる基を示す) で表されるキナゾリン系化合物、※

※④ 下記の式 (III) ;

【0021】

【化16】



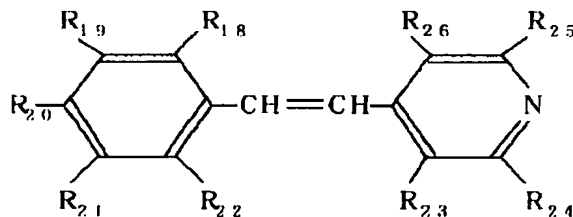
(III)

(式中、R₁₄~R₁₇は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコシキル基およびアリール基から選ばれる基を示す) で表されるスルファニルアミド系★

★化合物、および下記の式(IV_a)または(IV_b) ;

【0022】

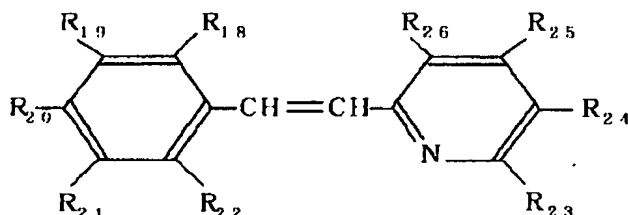
【化17】



(IV_a)

【0023】

【化18】



(IV_b)

(式中、R₁₈~R₂₅は各々独立して水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコシキル基およびアリール基から選ばれる基を示す) で表されるスチルバゾール系化合物、からなる群から選ばれる少なくとも1種の化合物を使用するのがよい。

【0024】そして上記④のイオン性界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤および両イオン性界面活性剤であればどのようなものも使用でき、その好ましい例としてはアルキルスルホン酸塩等(陰イオン性界面活性剤)、塩化ラウリルピリジニウム等(陽イオン性界面活性剤)を挙げることができる。そのうちでも、陽イオン性界面活性剤がより好ましい。

【0025】また、キノリン系化合物の代表例としては、キナリジン、3-アミノキノリン、8-アミノキノリン、6-メチルキノリン、7-メチルキノリン等を挙

げることができる。更に、キナゾリン系化合物の代表例としては、キナゾリンを挙げることができる。また、スルファニルアミド系化合物の代表例としては、スルファニルアミド、スルファニルベンジルアミン、スルファピリジン、スルファピラジン等を、そしてスチルバゾール系化合物の代表例としては2-スチルバゾール、4-スチルバゾール等を挙げることができる。

【0026】上記したように、錯体形成促進剤は1種類のみを使用しても、または2種以上を組み合わせ使用してもよく、特にキノリン系化合物、キナゾリン系化合物、スルファニルアミド系化合物およびスチルバゾール系化合物の1種とイオン性界面活性剤とを組み合わせ使用すると、コバルト(II)塩とチオール化合物との間の錯体形成が一層促進されて、鮮明で安定な呈色状態を得ることができる。

【0027】使用するコバルト(II)塩の種類、錯体形成促進剤の種類、検出しようとするチオール化合物の種類等で種々異なり得るが、本発明のチオール化合物測定用試薬組成物におけるコバルト(II)塩と錯体形成促進剤の使用割合は、一般に、重量で、コバルト(II)塩：錯体形成促進剤＝約3：1～約15：1の範囲にするのが好ましい。

【0028】チオール化合物の検出・測定を行うに際しては、コバルト(II)塩および錯体形成促進剤を、被検査液体中に順次に個別に加えても、同時に加えても、または予めコバルト(II)塩と錯体形成促進剤を混合しておいてその混合物を加えてもよい。そのうちでも、予めコバルト(II)塩と錯体形成促進剤とを固体状（粉末状）の乾燥状態で混合して長期保存可能な乾燥した試薬組成物としておき、チオール化合物の検査の際に、該試薬組成物の必要量を使用するのが便利である。該試薬組成物を被検査液体に添加する際には、固体状のまま直接加えてもよいが、水や適当な有機溶媒（例えばアルコール等）に溶かして溶液状にして加えるのが検出を速やかに行うことができ便利である。溶液状で加える場合は、コバルト(II)塩濃度が約0.2～2重量%の溶液にして加えるのが好ましい。また、コバルト(II)塩および錯体形成促進剤を適当な方法で濾紙やその他の材料からなる担体に担持させて、呈色試験紙や試験具を作成し、検出試験を行ってもよい。

【0029】また、コバルト(II)塩および錯体形成促進剤を含有するチオール化合物測定用試薬組成物は、必要に応じて、緩衝剤、安定剤等の他の成分を含有することができる。

【0030】このチオール化合物測定用試薬組成物は、臨床試料、工業試料、食品試料、研究試料、天然試料等のチオール化合物の検出・測定が必要な被検査物のすべてに対して有効に使用することができる。そして、被検査物中にチオール化合物が含まれると、錯体形成促進剤の作用によって、チオール化合物とコバルト(II)との間の錯体形成反応が促進されて、通常532nmに極大吸収波長を有する赤紫色の鮮明な呈色が発現されるので、該532nmにおける吸光度を測定することにより、チオール化合物の有無および濃度を検出・測定することができる。

【0031】また、コバルト(II)塩および錯体形成促進剤を、更に上記のチオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)の少なくとも1種と組み合わせて使用すると、上記したように、尿やその他の検体中に含まれる加水分解酵素によって、チオエステル化合物(V)またはチオエステル化合物(VI)が加水分解されて、上記式

(VII)または式(VIII)で表されるチオフェノールを生成し、これらのチオフェノールが錯体形成促進剤の存在下にコバルト(II)と532nmに極大吸収波長を有する赤紫色の鮮明な色を呈する錯体を形成するので、検体

中の加水分解酵素、ひいては白血球の有無や濃度を検出・測定することができる。

【0032】したがって本発明は、上記したようにチオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)の少なくとも1種、コバルト(II)塩並びに上記の錯体形成促進剤を使用して、加水分解酵素、ひいては白血球を検出・測定する方法を包含する。

【0033】チオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)は、上記した特願平3-191921号および特願平2-308669号に記載した方法およびその他任意の方法により製造することができる。

【0034】該チオエステル化合物(V)および(VI)において、アミノ酸残基またはペプチド基 A_1 または A_2 は、加水分解酵素によって加水分解可能なチオエステル結合を形成するものであればいずれでもよいが、L型、D型およびラセミ体、特にL型のアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンからのアミノ酸残基、またはそれらのアミノ酸の2～5個よりなるペプチド基がよい。また、アミノ保護基Bとしては、アミノ酸およびペプチドにおける常用のアミノ保護基であればよく、例えばアシル基、オキシカルバモイル基、ホスホリル基、カルバルモイル基、チオカルバモイル基、スルホニル基、スルフェニル基、ビニル基、シクロヘキセニル基等を挙げることができる。

【0035】また、基 $R'_1 \sim R'_6$ としては、水素；フッ素、塩素、臭素およびヨウ素、特に塩素および臭素；炭素原子数1～5個のアルキル基；フェニル基、ナフチル基；ベンジル基等のアリール基；ニトロ基；水酸基等を、基 $R'_6 \sim R'_{11}$ としては、水素；フッ素、塩素、臭素およびヨウ素、特に塩素および臭素；炭素原子数1～5個のアルキル基；フェニル基、ナフチル基；ベンジル基等のアリール基；メトキシ基、エトキシ基等のアルコキシ基；フェニルエチル基、フェニルプロピル基等のアルアルキル基；ベンジロキシ基等のアルアルコキシ基；ニトロ基；水酸基等を挙げることができる。

【0036】チオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)の具体例を挙げると以下のとおりであるが、勿論それに限定されない。

- $N-(p\text{-トルエンスルホニル})-L\text{-アラニルチオベンゼン}$
- $4-[N-(p\text{-トルエンスルホニル})-L\text{-アラニルチオ}]クロロベンゼン$
- $4-[N-(p\text{-トルエンスルホニル})-L\text{-アラニルチオ}]トルエン$
- $4-[N-(p\text{-トルエンスルホニル})-L\text{-アラニルチオ}]アニソール$
- $4-[N-(p\text{-トルエンスルホニル})-L\text{-アラニルチオ}]ニトロベンゼン$
- $8-(N-p\text{-トルエンスルホニル}-L\text{-アラニルチオ})キノリン$

- 5-クロロ-8-(N-p-トルエンシルホニル-L-アラニルチオ)キノリン
- 4-メチル-8-(N-p-トルエンシルホニル-L-アラニルチオ)キノリン
- 5-メトキシ-8-(N-p-トルエンシルホニル-L-アラニルチオ)キノリン
- 8-(N-カルボベンジルオキシ-L-アラニルチオ)キノリン
- 8-(N-t-ブトキシカルボニル-L-アラニルチオ)キノリン

【0037】被検査液体中の加水分解酵素および/または白血球を検出するに当たっては、チオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)の少なくとも1種、コバルト(II)塩並びに錯体形成促進剤を、被検査液体に順次に個別に加えても、同時に加えても、またはそれらを予め混合して加水分解酵素または白血球検出用の試薬組成物を予め形成しておいて、その試薬組成物を検査時に用いてもよい。更に、チオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)の少なくとも1種、コバルト(II)塩並びに錯体形成促進剤を適当な方法で濾紙、天然繊維や合成繊維からなる繊維フリースや布帛、天然や合成の無機および有機発泡体や多孔体等の適当な担体に担持させて呈色試験紙や呈色試験具を形成しておき、それらの試験紙や試験具を使用して、加水分解酵素や白血球の検出試験を行ってもよい。

【0038】使用するチオエステル化合物(V)やチオエステル化合物(VI)の種類、コバルト(II)塩の種類、錯体形成促進剤の種類等により種々異なり得るが、加水分解酵素および白血球の検出・測定に当たっては、一般にモル比で、チオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)の少なくとも1種：コバルト(II)塩：錯体形成促進剤=約40：3：1～約20：10：3の割合で使用するのが好ましい。また、加水分解酵素の検出に際しては、被検出液体1リットル当たり、チオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)の少なくとも1種を約0.2～20ミリモル使用するのがよい。次に本発明を実施例により具体的に説明するが本発明はそれにより限定されない。

【0039】

【実施例】

《実施例 1》試験管に1重量%酢酸コバルト(II)水溶液1.2ml、0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.0)40μlおよび1重量%塩化ラウリルピリジニウム水溶液40μlを加えた。次に、濃度10mMのチオフェノールのエタノール溶液20μlを加えて、液の532nmにおける吸光度の経時変化を吸光度計(日立製作所製U-2000型)を用いて測定して、コバルト(II)とチオフェノールとの間の錯体形成状態を調べた。その結果を下記の表1に示す。

【0040】《実施例 2》試験管に1重量%酢酸コバ

ルト(II)水溶液1.2ml、0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.0)40μlおよび1重量%3-アミノキノリンのエタノール溶液40μlを加えた。次に、濃度10mMのチオフェノールのエタノール溶液20μlを加えて、液の532nmにおける吸光度の経時変化を実施例1と同様にして測定した。その結果を下記の表1に示す。

【0041】《実施例 3》試験管に1重量%酢酸コバルト(II)水溶液1.2ml、0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.0)40μlおよび1重量%6-メチルキノリンのエタノール溶液40μlを加えた。次に、濃度10mMのチオフェノールのエタノール溶液20μlを加えて、液の532nmにおける吸光度の経時変化を実施例1と同様にして測定した。その結果を下記の表1に示す。

【0042】《実施例 4》試験管に1重量%酢酸コバルト(II)水溶液1.2ml、0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.0)40μlおよび1重量%キナゾリンのエタノール溶液40μlを加えた。次に、濃度10mMのチオフェノールのエタノール溶液20μlを加えて、液の532nmにおける吸光度の経時変化を実施例1と同様にして測定した。その結果を下記の表1に示す。

【0043】《実施例 5》試験管に1重量%酢酸コバルト(II)水溶液1.2ml、0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.0)40μlおよび1重量%スルファニルアミドのエタノール溶液40μlを加えた。次に、濃度10mMのチオフェノールのエタノール溶液20μlを加えて、液の532nmにおける吸光度の経時変化を実施例1と同様にして測定した。その結果を下記の表1に示す。

【0044】《実施例 6》試験管に1重量%酢酸コバルト(II)水溶液1.2ml、0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.0)40μlおよび1重量%2-スチルバゾールのエタノール溶液40μlを加えた。次に、濃度10mMのチオフェノールのエタノール溶液20μlを加えて、液の532nmにおける吸光度の経時変化を実施例1と同様にして測定した。その結果を下記の表1に示す。

【0045】《実施例 7》試験管に1重量%酢酸コバルト(II)水溶液1.2ml、0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.0)40μlおよび1重量%スルホコハク酸ナトリウム水溶液40μlを加えた。次に、濃度10mMのチオフェノールのエタノール溶液20μlを加えて、液の532nmにおける吸光度の経時変化を実施例1と同様にして測定した。その結果を下記の表1に示す。

【0046】《比較例 1》試験管に1重量%酢酸コバルト(II)水溶液1.2ml、0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.0)40μlおよびエタノール40μlを加えた。次に、濃度10mMのチオフェノールのエタノール溶液20μlを加えて、液の532nmにおける吸光度

の経時変化を実施例1と同様にして測定した。その結果 *【0047】
を下記の表1に示す。 *【表1】

例	532nmにおける吸光度					
	当初	1分後	2分後	3分後	4分後	5分後
実施例1	0.189	0.242	0.331	0.404	0.459	0.503
実施例2	0.158	0.336	0.421	0.452	0.482	0.488
実施例3	0.180	0.372	0.471	0.554	0.590	0.591
実施例4	0.280	0.510	0.636	0.701	0.736	0.748
実施例5	0.184	0.354	0.495	0.589	0.649	0.685
実施例6	0.121	0.196	0.254	0.312	0.379	0.433
実施例7	0.304	0.416	0.524	0.605	0.659	0.699
比較例1	0.002	0.046	0.083	0.113	0.134	0.153

【0048】表1の結果から、コバルト(II)塩と共に錯体形成促進剤を使用している本発明の実施例1～7では、反応5分後までに波長532nmにおける吸光度が大きく上昇し、コバルト(II)とチオフェノールとの間の錯体形成反応が促進されること、これに対して錯体形成促進剤を添加していない比較例1では反応5分後でも532nmにおける吸光度が当初とあまり変わらず、コバルト(II)とチオフェノールとの間の錯体形成がほとんどなされず、チオフェノールの検出ができないことがわかる。

【0049】

【発明の効果】従来、水溶液中に含まれるチオール化合物※

※物のコバルト(II)塩による検出はほとんど不可能であったが、コバルト(II)塩および錯体形成促進剤を含有する本発明の試薬組成物を使用した場合には、高価な機器、長い測定時間、複雑な操作、熟練等を必要とすることなく、高感度で且つ短時間で、水性溶液中に含まれるチオール化合物を特異的に検出・測定することができる。更に本発明では、チオエステル化合物(V)およびチオエステル化合物(VI)の少なくとも1種、コバルト(II)塩並びに錯体形成促進剤を使用することによって、被検査液体中における加水分解酵素、ひいては白血球の有無および濃度を、簡単に、安定して且つ高感度で特異的に検出・測定することができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵

G01N 33/49
33/50

識別記号

庁内整理番号

A 7055-2 J
K 7055-2 J

F I

技術表示箇所